

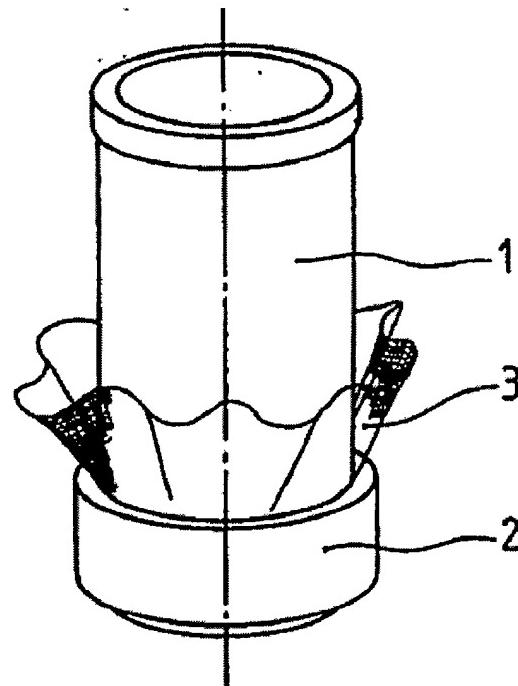
Filtration device for sepg. cell components from suspension - comprises modular elements, e.g. of PTFE, each retaining filter cloth and stacked together to form a column

Patent number: CH674713
Publication date: 1990-07-13
Inventor: KNOPF ULRICH C DR
Applicant: AGROGEN STIFTUNG;; ULRICH C KNOPF DR
Classification:
- **international:** B01D25/02; B01D29/50; B01D35/30
- **european:** B01D25/02; B01D29/01; B01D35/30B2
Application number: CH19880001816 19880513
Priority number(s): CH19880001816 19880513

Abstract of CH674713

Filtration device for stepwise filtration and sorting of solid components from a suspension consists of several modular, cylindrical elements, stacked vertically one into the other. Each of the elements is provided with a piece of filter cloth. Pref. the elements are made of a heat-and pressure-resistant synthetic polymer such as polyamide, polyoxymethylene or pref. PTFE. The filter cloth is a gauze of natural or synthetic fibres of mesh size 1-500 microns, pref. of polyamide, polypropylene or polyester, e.g. poly(ethylene terephthalate).

USE/ADVANTAGE - The device is used to sort cell components (e.g. protoplasts, nuclei, mitochondria or chloroplasts) from an aq. suspension prep'd. by disintegration of tissue or individual cells. The filter cloths do not require supports (which can cause blockages) and the elements do not have to be specially shaped. The assembled device can be sterilised by auto cleaving.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

EI

DA

CH 674713 A5



SCHWEIZERISCHE EidGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfolgspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-Liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

② PATENTSCHRIFT A5

① Gesuchsnr.: 1816/88

② Anmeldungsdatum: 13.05.1988

③ Patent erteilt: 13.07.1990

④ Patentschrift veröffentlicht: 18.07.1990

① CH 674713 A5

⑤ Int. Cl.: B 01 D 35/30
B 01 D 28/50
B 01 D 25/02

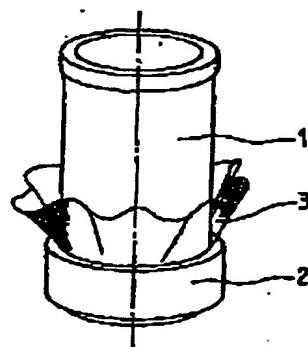
③ Inhaber:
Agrogen-Stiftung, Fribourg
Dr. Ulrich C. Knopf, Fribourg

⑦ Erfinder:
Knopf, Ulrich C., Dr., Fribourg

⑥ Vertreter:
Dr. Hans Ulrich Gassmann, Fribourg

④ Stufen-Filtrationsgerät.

⑤ Modulares Filtergerät für das Klassieren und Trennen bzw. Isolieren von mikroskopischen biologischen Objekten, wie Einzelzellen, Protoplasten, Zellkernen und andern Organellen, aus wässrigen Suspensionen. Das Gerät besteht aus zusammensteckbaren Elementen, die ihrerseits aus je zwei hochzyndrischen Stücken (1, 2) unter Zwischenlage je eines Stücks Filtergewebe (3) zusammengesteckt werden. Als Filtergewebe werden Gazegewebe aus natürlichen oder synthetischen Fasern wie Seide, Nylon, Polypropylen und Polyester verwendet. Durch Zusammenbau von Elementen mit Geweben verschiedenster Maschenweite kann eine Filtrierkolonne zum gleichzeitigen Trennen verschiedener Bestandteile aufgebaut werden.



CH 674 713 A5

2

Beschreibung

In der biologischen und biochemischen Laboratoriumstechnik, insbesondere in der genetischen Forschung, steht man sich häufig vor die Aufgabe gestellt, aus einer vorzugsweise wässrigen und gepufferten Suspension von verschiedenen Zellbestandteilen, wie sie beispielsweise durch mechanische oder enzymatische Desintegration von Geweben oder auch aus Zellkulturen gewonnen wird, bestimmte Bestandteile auszutrennen und zu isolieren. Insbesondere handelt es sich dabei um das Ausisolieren von Protoplasten und Zellorganellen, wie z.B. Zellkerne, Mitochondrien oder Chloroplasten.

Bei darartigen Sortier- und Isolieraufgaben war man bisher auf relativ langwierige und aufwendige Methoden, wie z.B. die Zentrifugation mittels eines Dichtogradienten angewiesen. Das dabei übliche Arbeitsverfahren mit Saccharoselösungen erfordert z.B. eine geschickte Zentrifuge; zudem sind die osmotischen Einflüsse infolge der variablen Zuckerkonzentration den Zellbestandteilen oftmals nicht zuträglich, und es besteht auch immer die Gefahr einer enzymatischen Kontamination.

Bekannt sind z.B. auch Klassiergeräte, die auf optischem und/oder elektronischem Weg die Bestandteile nach ihrer Größe oder nach andern Kriterien baueteilen und auf automatischem Wege, z.B. durch eine in einen Flüssigkeitsstrom eingebaute Weiche, aussortieren. Sofern es sich lediglich um eine Klassierung der Bestandteile auf Grund ihrer Größe handelt, besteht der einfachste Weg zum Aussortieren in einer Filtration mittels siebähnlicher Filtrationsmittel. Durch vertikales Übereinanderordnen von Siebelementen verschiedener Lochweiten können dabei in einem Arbeitsgang mehrere Bestandteile gleichzeitig voneinander getrennt und aussortiert werden.

Als Siebelemente für biologische Bestandteile, wie z.B. einzelne Zellen, Protoplasten, und Organellen, wie Zellkerne, Chloroplasten oder Mitochondrien eignen sich in hervorragender Weise Gazegegewebe, wie sie z.B. aus dem Müllergewebe bekannt sind. Solche Gewebe werden in verschiedenen Maschenweiten zwischen 1 und 500 µm aus verschiedenen natürlichen und synthetischen Fasern, z.B. aus Baumwolle, natürlicher Seide oder vorzugsweise aus synthetischen Monofilamentfasern aus Polyamiden, Polypropylen und Polyestern, hergestellt und im Handel angeboten. Insbesondere die synthetischen Gazegegewebe sind mechanisch stabil, waserbeständig, leicht zu reinigen und können ohne weiteres nach den in der Biologie üblichen Methoden sterilisiert werden, z.B. in einem Autoklaven bei 120°C und 1 atm Überdruck.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein für das biologisch-genetische Laboratorium, insbesonders für die Trennung von Zellbestandteilen konzipiertes Filtergerät, das aus gleichartigen modularen Elementen zu einer Kette mit beliebig vielen Stufen zusammengebaut werden kann. Die modularen Elemente bestehen dabei aus je zwei hohzyklindrischen Stücken, die unter Zwischenlage je eines Stücks Filtergewebe zusammengesteckt werden.

Durch Zusammenstecken einer Anzahl solcher zweiteiliger Elemente lässt sich eine Filterkette von beliebiger Größe bauen. Vorzugswise werden die einzelnen Elemente von oben nach unten mit Filtergewebe abnehmender Maschenweite bestückt. Damit kann z.B. eine Suspension von biologischen Teilchen in Fraktionen verschiedener Teilchengrößen aufgetrennt werden.

Ein besonderer Vorteil der erfundungsgemäßen Vorrichtung ist dabei, dass die Stärke von Filtergewebe nicht besonders zugeschnitten werden müssen. Ein einfacher, z.B. vierseitiger Abschnitt genügt; infolge der besonderen Konstruktionsmerkmale der einzelnen Elemente wird das Filtergewebe beim Zusammenstecken der Teile glatt und faltenfrei über den offenen Querschnitt gestreckt. Der nicht benötigte Teil des Gewebestückes ragt dabei aus der Stelle, wo die Elemente zusammengesteckt werden, frei heraus. Da das Gewebe beim Zusammenstecken auch eine genügende Spannung erhält, ist ein Abschneiden durch Lochplatten, Drahtgitter, Glassplitter oder dergl. nicht nötig. Probleme infolge Unordnung oder Verstopfung der Filter werden ebenfalls weitgehend vermieden.

Ein weiterer Vorteil, der sich vor allem auf den Zeitaufwand und die Präparationskosten auswirkt, besteht darin, dass das zusammengesetzte Gerät inklusive der eingespannten Filtergewebe als Ganzes nach den in der Biologie üblichen Methoden unter Hitze und Dampf, z.B. in einem Autoklaven bei 120°C und 1 atm Überdruck beliebig oft sterilisiert werden kann. Auf die relativ kostenpflichtigen vorsterilierten Einwegfilter kann deshalb dank dem erfundungsgemäßen Gerät verzichtet werden.

Der Aufbau des Geräts ist aus den Figuren 1 bis 4 ersichtlich:

Fig. 1 zeigt in perspektivischer Darstellung eines der modularen Elemente des Filtergeräts, bestehend aus zwei unter Zwischenlage eines Stücks Filtergewebe zusammengesteckten hohzyklindrischen Teilen.

Fig. 2 zeigt, ebenfalls in perspektivischer Darstellung, die beiden Teile eines zusammensteckbaren Filterelements und das dazwischen einklemmende Stück Filtergewebe.

Fig. 3 zeigt zwei verschiedene mit je einer zentralen Bohrung versehene Platten, die dem Gerät als untere Abschlussplatten angefügt werden können, derart, dass es direkt auf eine in der Figur ebenfalls dargestellte Petrischale aufgesetzt werden kann.

Fig. 4 zeigt die einzelnen Teile eines Elements des Filtergeräts im Längsschnitt; das zwischen den beiden beiden oberen Teilen einzusetzende Filtergewebe ist in dieser Darstellung weggelassen.

Fig. 1 stellt ein aus zwei zylindrischen Stücken (1) und (2) unter Zwischenlage des Filtergewebes (3) zusammengestcktes Filterelement dar.

In Fig. 2 sind die beiden zylindrischen Stücke (1) und (2) sowie das Filtergewebe (3) einzeln dargestellt. Das längere Stück (1) besitzt an seinem oberen Ende einen verstärkten äusseren Rand (9); seine Innenseite ist eine glatte Zylinderfläche. Das

untere kurze Zylinderstück (2), mit einem Innendurchmesser, der etwas grösser ist als der Ausendurchmesser am unteren Rand des grösseren Zylindersückes (1), trägt an seiner Innentäfelchen unterhalb seines oberen Randes einen ringförmigen Wulst (4), durch welchen das Filtergewebe beim Zusammenstecken gespannt und in seiner Lage festgehalten wird. Der Ausendurchmesser des Stückes (2) ist an seinem unteren Ende (10) stufenförmig verjüngt und fügt sich beim Zusammenstecken mehrerer Filterelemente passend in den Innendurchmesser eines weiteren Stückes (1), womit aus mehreren Elementen beliebig lange Filterkolonnen aufgebaut werden können.

In Fig. 3 sind zwei plattenförmige Endstücke (5) und (7) dargestellt, jedes mit einem zentralen Loch, in welches das zylindrische Stück (2) mit seinem unteren Ende eingesteckt werden kann. Der äussere Rand (11) der beiden Endstücke ist etwas eingezogen, so dass die Platten passend auf je eine Petrischale (6), (8) aufgesetzt werden können.

In der Fig. 4 sind die zylindrischen Stücke (1) und (2) und die beiden Endplatten (5) und (7) im Schnitt dargestellt, wodurch der Wulst (4) und die Durchmesserverhältnisse der zusammensteckbaren Stücke klar ersichtlich werden.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung, die in den Figuren nicht gezeigt ist, kann im obersten Filterelement oberhalb des obersten Filtergewebes eine zum Filter im wesentlichen parallele Platte angeordnet werden, die z.B. durch einen Wechselstrommagneten in vertikale Schwingungen versetzt wird. Eine derartige schwingende Platte erleichtert und beschleunigt in vielen Fällen die Filtration, insbesondere dort, wo mit sehr feinen Filtern gearbeitet wird, oder mit Materialien, die auf dem Filter zur Bildung einer kompakten, verstopften Schicht neigen.

Beispiel 1: Isolation von keimfreien Protoplasten.

Ein Filtrationsgerät gemäß der vorliegenden Erfindung wird zusammengesteckt aus zwei Elementen, jedes bestehend aus einem zylindrischen Stück (1) mit einer Länge von 71 mm und einem Außen- durchmesser von 38 mm sowie einem zylindrischen Stück (2) mit einer Länge von 22 mm und einem Ausendurchmesser von 45 mm. Im ersten (oberen) Element befindet sich zwischen den Stücken (1) und (2) ein Filtergewebe mit einer Maschenweite von 100 µm und im zweiten mit einer solchen von 50 µm. Das zusammengesteckte Gerät wurde in eine Aluminiumfolie eingewickelt und anschliessend während 20 min im Autoklaven bei 125°C und 1 atm sterilisiert.

Blätter von *in vitro* kultivierten keimfreien Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) wurden in eine wässrige Lösung mit einem pH von 5,7, enthaltend pro Liter

1480 mg CaCl₂
27,2 mg KH₂PO₄
248 mg MgSO₄·7H₂O
0,025 mg CuSO₄·5H₂O
0,18 mg KJ
und 130 g Mannitol
eingelegt und während 1 Stunde im Dunkeln bei 28°C

vorplasmolytiert. Danach wurden die Blätter in 100 ml einer Lösung, enthaltend 500 mg Cellulase «Onozuka», 100 mg Pectinase «Agrozym» und 18 g Mannitol eingelegt und während 18 Stunden bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

Die so gewonnene Suspension, die neben nicht abgebauten Blattbestandteilen und Zellen mit nicht aufgebrochenen Zellwänden eine grosse Anzahl Protoplasten, d.h. von ihrer Zellwand befreiten Zellen, enthielt, wurde in die Filtrationskolonne gegeben. Nach der Filtration wurden in der obersten Stufe vorliegend verbleibende Aggregate aus der Plasmolyse sowie einige grössere Protoplasten und in der als Auffanggefäß dienenden Petrischale praktisch ausschliesslich Protoplaste gefunden. Die nach dieser Methode präparierten und isolierten Protoplasten wiesen zu mindestens 95% eine volle Lebens- und Teilungsfähigkeit auf.

Beispiel 2: Isolation von Zellkernen.

Blätter von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) wurden in einem Kembreisolutionspuffer, enthaltend pro Liter
25 10 mMol 2-Morpholino-äthansulfosäuremonohydrat
10 mMol Saccharose,
0,01 Gew.% Triton (Alkyphenyl-polyäthyleenglykol)
80 10 mMol Natriumchlorid,
10 mMol Kaliumchlorid
2,5 mMol 1,4-Dithioerythrit (DTE)
2,5 mMol Aethylendiamin-tetraessigsäure-Na-Salz-Dihydrat und
35 0,1 mMol N, N'-bis(β-aminopropyl)-1,4-diaminobutan (Spermin) bei 40°C in kleine Stücke zerschnitten und anschliessend noch während 5 Minuten leicht geschüttelt.

Anschliessend wurde die Suspension in ein erfindungsgemässes Stufenfiltrationsgerät gegeben, das in vier Stufen mit verschiedenen Nylongeweben bestückt war, mit Maschenweiten, von oben nach unten gezählt, von 100, 40, 20 und 10 µm. Die bei der Desintegration entstandenen Bruchstücke des Blattgewebes sammelten sich dabei in den verschiedenen Filtrationsstufen des Geräts, während eine Suspension, enthaltend die Zellkerne und kleinere Organellen wie Mitochondrien und Chloroplasten die Filterkolonne nach unten verließen. Durch eine weitere Filtrationsstufe mit einem Nylongewebe von 5 µm Maschenweite konnten schliesslich die Zellkerne von den kleineren Organellen getrennt werden.

Durch Waschen des feinsten Nylonnetzes mit einem kleinen Volumen der oben beschriebenen Puffertlösung konnte schliesslich eine fast ausschliesslich Zellkerne enthaltende Suspension gewonnen und für zellbiologische, genetische und biochemische Untersuchungen bereitgestellt werden.

Patentsprüche

1. Filtrationsgerät zum stufenweisen Filtern und Aussortieren von festen Bestandteilen aus ei-

ner Suspension, dadurch gekennzeichnet, dass es aus mehreren modulähnlichen, in vertikaler Anordnung ineinander gesteckten zylindrischen Elementen besteht, wobei die einzelnen Elemente je mit einem Stück Filtergewebe versehen sind.

2. Filtrationsgerät gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die modulähnlichen zylindrischen Elemente unter sich gleich sind und aus je zwei hohzyklindrischen Stücken bestehen, die, unter Zwischenlage eines Stücks Filtergewebe, zusammengesteckt sind, wobei das untere, kürzere Stück auf seiner Innenfläche einen ringförmigen Wulst aufweist, dessen Durchmesser dem Außen durchmesser des oberen, längeren Stücks entspricht, und wobei das Filtergewebe beim Zusammenstecken zwischen den beiden zylindrischen Stücken straff gespannt und festgeklemmt wird.

3. Filtrationsgerät gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Zuschliff des Filtergewebes von beliebiger Form ist, mit der Bedingung, dass die untere Querschnittsfläche des oberen zylindrischen vollständig vom Gewebe bedeckt und darüberhinaus ein vorstehender Rand vorhanden ist, der für das alleseitige Eindecken des Gewebes zwischen der Außenfläche des oberen Stücks und der Innenfläche des Wulstes am unteren Stück ausreicht.

4. Filtrationsgerät gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es an seinem unteren Ende noch ein kreisrundes plattenförmiges Abdeckstück aufweist, das auf eine Petrischale passender Größe aufgesetzt werden kann.

5. Filtrationsgerät gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass seine Bauelemente aus einem hitze- und druckbeständigen synthetischen Hochpolymeren wie Polyamid, Polyoxymethylen, oder vorzugsweise aus Polytetrafluoroethylen, bestehen.

6. Filtrationsgerät gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Filtergewebe ein Gazegewebe aus natürlichen oder synthetischen Fasern mit einer Maschenweite zwischen 1 und 500 µm ist.

7. Filtrationsgerät gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die synthetischen Fasern aus hitze- und druckbeständigen Hochpolymeren wie Polyamiden, Polypropylen oder Polyester, z.B. Polyethyl-Terephthalat bestehen.

8. Filtrationsgerät gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es im zuoberst angeordneten Element noch eine mechanische Filterhilfe, bestehend aus einer durch magnetischen Antrieb vertikal vibrierenden horizontalen Platte enthält.

9. Verwendung des Filtrationsgeräts gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Aussortieren von Zellbestandteilen aus einer durch Desintegration von Geweben oder einzelnen Zellen gewonnenen wässrigen Suspension.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

CH 674 713 A5

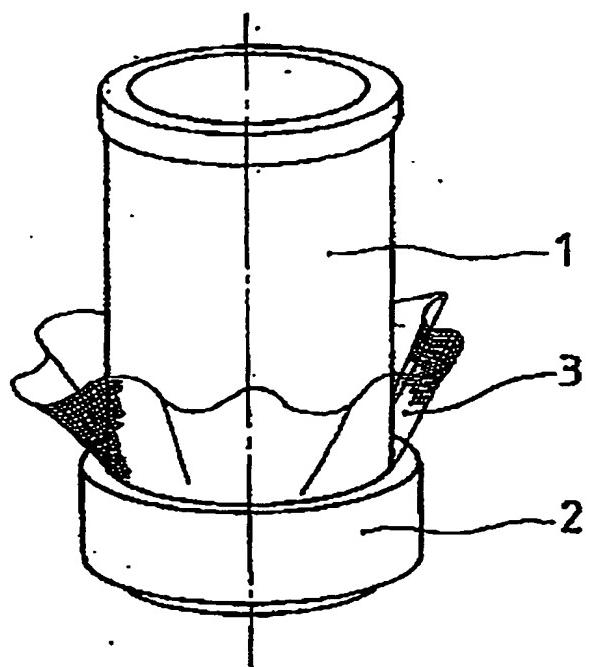


Fig. 1

CH 674 719 A5

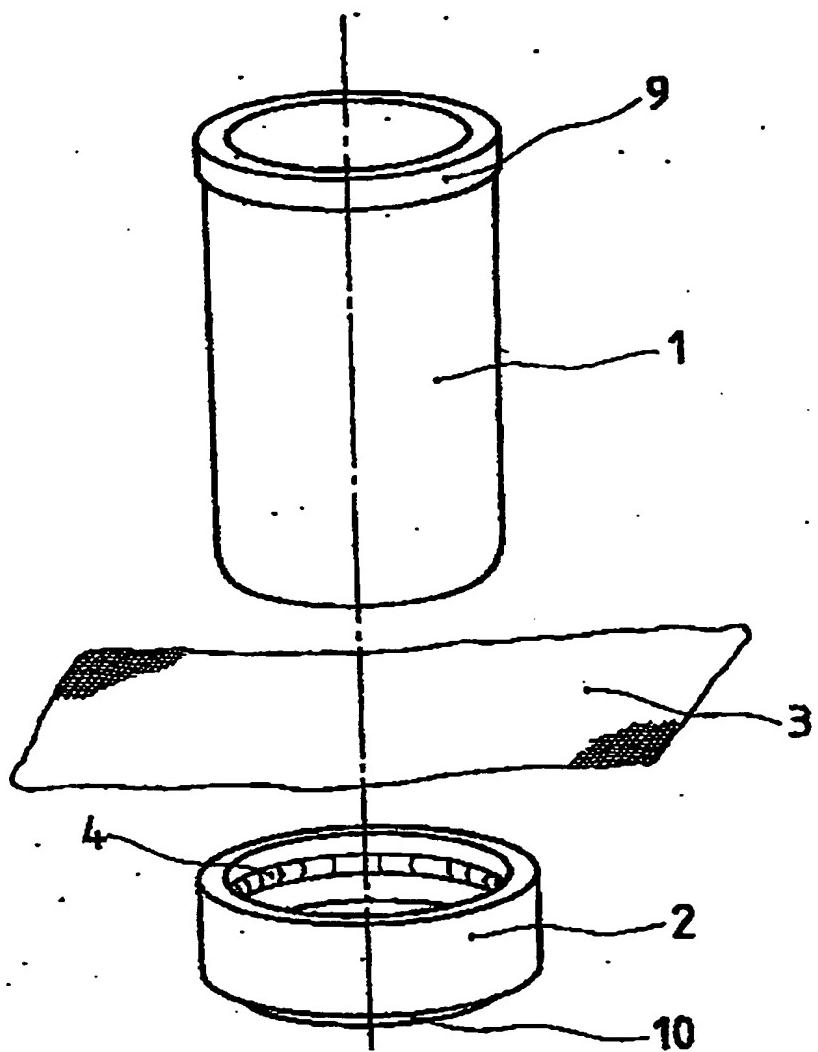


Fig. 2

CH 674 713 A5

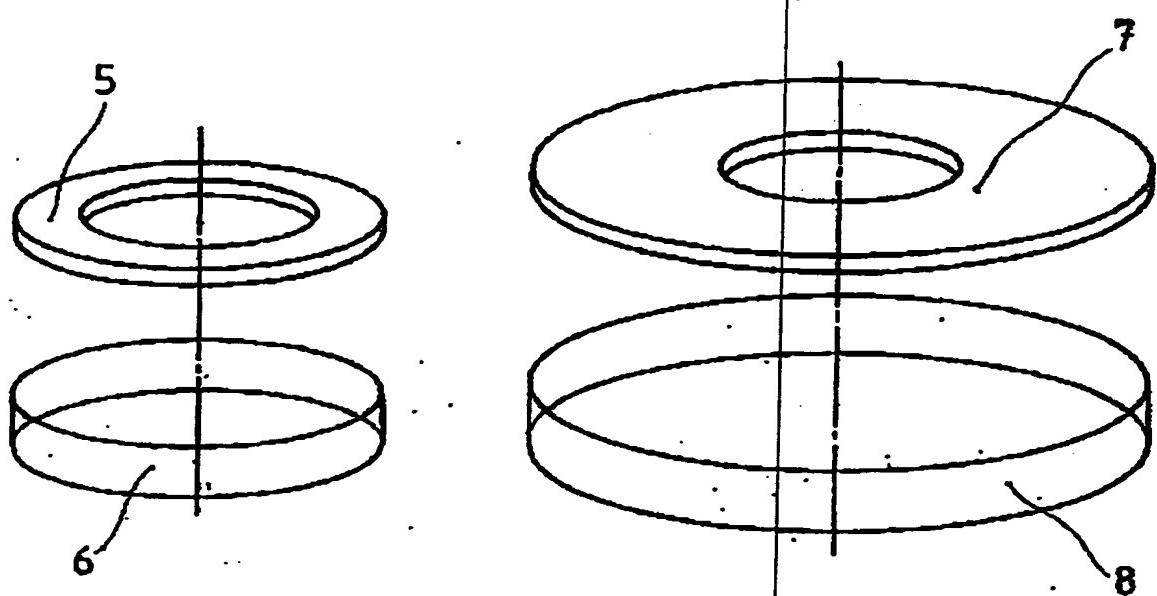


Fig. 3

CH 674 713 A5

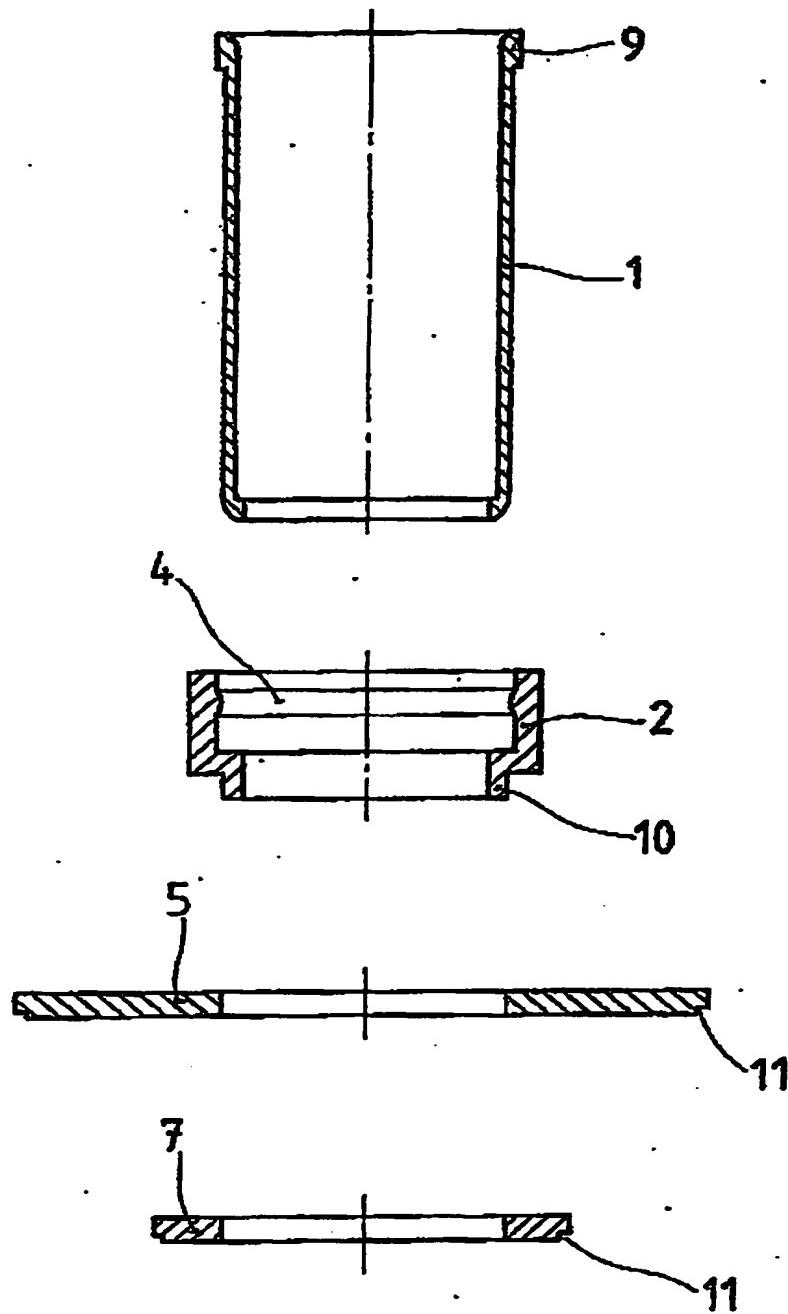


Fig. 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.